



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類5 C07K 13/00, 3/08, A61K 37/02		AI	(11) 国際公開番号 WO 90/06952
			(43) 国際公開日 1990年6月28日 (28.06.90)
(21) 国際出願番号 PCT/J P89/01292		(81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US.	
(22) 国際出願日 1989年12月22日 (22. 12. 89)			
(30) 優先権データ 特願昭 63/324747 1988年12月22日 (22. 12. 88) JP 特願平 1/199176 1989年7月31日 (31. 07. 89) JP		添付公開書類 国際調査報告書	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) キリン-アムジエン・インコーポレーテッド (KIRIN-AMGEN, INC.) (US/US) カルフォルニア・91320、サウザンド・オークス、 オーク・テラス・レイン・1900 California, (US)			
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 石川リカ (ISHIKAWA, Rika) (JP/JP) 〒189 東京都東大和市高木1-36-2 Tokyo, (JP) 岡田雄治 (OKADA, Yuji) (JP/JP) 柿谷 誠 (KAKITANI, Makoto) (JP/JP) 〒371 群馬県前橋市上小出町391 Gunma, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 川口義雄, 外 (KAWAGUCHI, Yoshio et al.) 〒160 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 山田ビル Tokyo, (JP)			

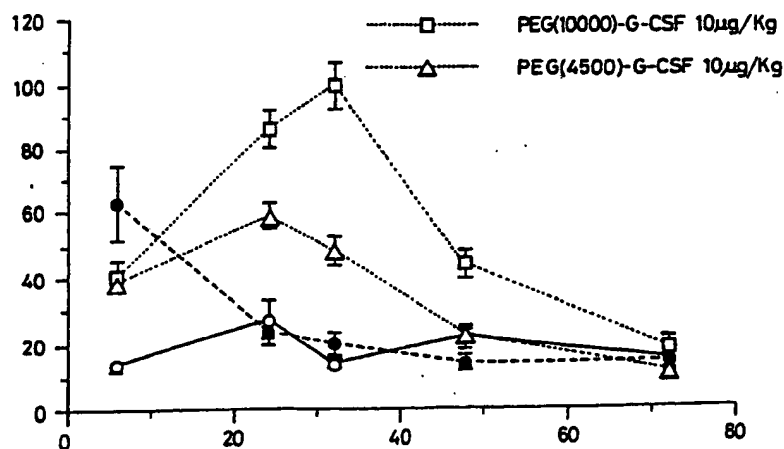
## (54) Title: CHEMICALLY MODIFIED GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR

(54) 発明の名称 化学修飾顆粒球コロニー刺激因子

NUMBER OF NEUTROPHILS

好中球数

(×100/μl)



(I)

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln  
Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg  
Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu  
Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro  
Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly  
Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser  
Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln  
Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu  
Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu  
Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val  
Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met  
Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro  
Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala  
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala  
Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr  
Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

(57) Abstract

投与後経過時間 (時) TIME AFTER MEDICATION (HOUR)

This invention provides a chemically modified protein prepared by combining polyethylene glycol with a polypeptide having substantially the following amino acid sequence and comprising the product of manifestation by a host cell of a foreign DNA sequence (I), wherein n is 0 or 1. This protein has a more lasting action of increasing neutrophils than that of the human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) known heretofore.

(57) 要約

本発明は、実質的に以下のアミノ酸配列を有し、外来性DNA配列の宿主細胞による発現産物であることを特徴とするポリペプチドにポリエチレングリコールを結合してなる化学修飾蛋白質：

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln  
Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg  
Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu  
Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro  
Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly  
Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser  
Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln  
Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu  
Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu  
Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val  
Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met  
Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro  
Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala  
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala  
Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr  
Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

(n=0又は1)

を提供するものである。

この化学修飾蛋白質は、従来のヒト顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)と比較して、好中球の増加作用がより長く持続するものである。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア  
AU オーストラリア  
BB パルバードス  
BE ベルギー  
BF ブルキナ・ファソ  
BG ブルガリア  
BJ ベナン  
BR ブラジル  
CA カナダ  
CF 中央アフリカ共和国  
CG コンゴ  
CH スイス  
CM カメルーン  
DE 西ドイツ  
DK デンマーク

ES スペイン  
FI フィンランド  
FR フランス  
GA ガボン  
GB イギリス  
HU ハンガリー  
IT イタリア  
JP 日本  
KP 朝鮮民主主義人民共和国  
KR 大韓民国  
LI リヒテンシュタイン  
LK スリランカ  
LU ルクセンブルグ  
MC モナコ

MG マダガスカル  
ML マリ  
MR モーリタニア  
MW マラウイ  
NL オランダ  
NO ノルウェー  
RO ルーマニア  
SD スーダン  
SE スウェーデン  
SN セネガル  
SU ソビエト連邦  
TD チャード  
TG トーゴ  
US 米国

- 1 -

## 明 細 書

## 化学修飾顆粒球コロニー刺激因子

## 〔技術分野〕

この発明は、顆粒球コロニー刺激因子（G-C S F）の化学修飾に関し、この修飾はG-C S Fの化学的及び／又は生理学的性質を変え得るものである。

## 〔背景技術〕

ヒトG-C S Fは、造血促進因子の一つであり、ヒト膀胱癌細胞系5637（ATCC HT8-9）の培養液中に存在していることが示されている（ウェルト等；Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 1526-1530, (1985)）。またこの遺伝子をコードするDNA配列が決定され（特表昭63-500636）、遺伝子組換えによるヒトG-C S Fの生産が可能となっている。

ヒトG-C S Fは、通常の造血障害の治療や化学療法又は放射線療法による造血障害の治療、骨髄移植時或は創傷治癒熱症治療及び細菌性炎症治療に有効である（ウェルト等；前述）。

一方、一般に生理活性蛋白質を投与した時に、生体内におけ

るクリアランスが速いために、その薬効が短時間しか得られないことがある。また、蛋白質の疎水性が高い場合には、その安定性に問題が生じる場合がある。

この様な血中停滞時間の延長や安定性の改善、或は抗原性の消失を目的として、ポリエチレングリコールで生理活性蛋白質を修飾する方法が知られている。例えば、特表昭62-289522では、ポリエチレングリコール等で修飾したTNFの免疫原性の低下について開示されている。また、特表昭62-503171では、ポリエチレングリコール等で修飾したIL-2, IFN- $\beta$ の水溶液中での凝集性の低下、血中半減期の延長、免疫原性の減少が開示されている。この他にもプラスミノゲン活性化因子（特表昭63-60938）やIL-2, IFN- $\gamma$ , SOD（特表昭63-10800）並びにIAP（特表昭63-126900）で、ポリエチレングリコール修飾による血中半減期の延長或いは抗原性、免疫原性の消失が開示されている。

しかし、いずれの場合も、ヒトG-CSFにポリエチレングリコールを修飾させたときに予想される生物学的活性、薬理動態の改善効果については開示されていない。

ヒトG-CSFを体内に投与した時、生体内における血中停

滞時間を延長し、その結果、期待し得る薬効の持続性をより高めることが望まれている。更には、白血球減少時における白血球の回復をより早めるようなヒトG-CSFが望まれている。

〔発明の開示〕

ヒトG-CSFにおけるこのような問題を解決すべく、本発明者等は検討を重ねた結果、ポリエチレングリコールをヒトG-CSFに結合させることによって、上記課題を解決できることを見出し、本発明に到達した。

本発明におけるヒトG-CSFは、遺伝子組換えによって大腸菌、動物細胞等の宿主を形質転換して得た形質転換体から産生せしめ単離精製して得られたものであればいずれのものでも使用することができる。

しかし、それらの中でも純度良く均質大量に入手できる、実質的に次のアミノ酸配列を有する遺伝子組換え大腸菌により産生されたヒトG-CSFが特に好ましいものである。

- 4 -

(Met)n

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln  
Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg  
Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu  
Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro  
Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly  
Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser  
Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln  
Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu  
Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu  
Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val  
Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met  
Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro  
Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala  
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala  
Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr  
Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

(n=0又は1)

上記のヒト G-C S F は、例えば特表昭 63-500636 に開示の方法に従い得ることができる。ここで「実質的」とは、アミノ酸配列が同一である場合の他に、天然ヒト G-C S F 蛋白との間に有害な機能的非類似性を生じさせないような 1 以上のアミノ酸変化（即ち欠失、付加、挿入、置換）を含み得ることを意味する。

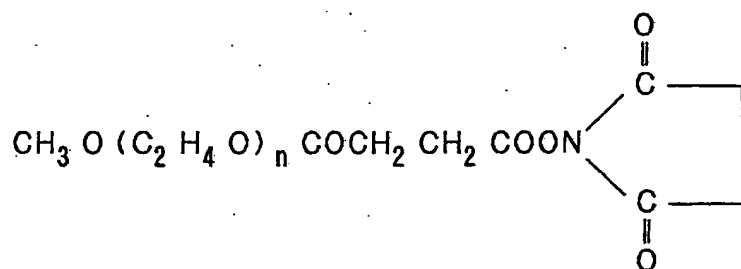
更に好ましくは、実質的に前記のアミノ酸配列を有するポリペプチドにおいて、少なくとも 1 つ以上のリジン残基、或いは少なくとも 1 つ以上のアスパラギン酸残基かグルタミン酸残基を持つものを使用する。

本発明において前記ヒト G-C S F とポリエチレングリコールとは、ポリペプチドのアミノ酸残基を介して互いに共有結合している。該残基は遊離アミノ基或いは遊離カルボキシル基等を有する任意の反応性アミノ酸であり、活性化されたポリエチレングリコールの反応性基がこれら遊離アミノ基或いは遊離カルボキシル基等に連結される。遊離アミノ基を有するアミノ酸残基としてはリジン或いは N 末端アミノ酸残基が、遊離カルボキシル基を有するアミノ酸残基としてはアスパラギン酸、グルタミン酸或いは C 末端アミノ酸残基が、それぞれ挙げられる。

- 6 -

使用するポリエチレングリコールの分子量は特定のものに限定される必要はないが、通常約 500～20,000、好ましくは約 4,000～10,000のものが用いられる。

ポリエチレングリコールは、末端反応性基（スパーサー）を介してヒト G-C S F 上に結合される。スパーサーを有するポリエチレングリコールを、活性型ポリエチレングリコールと称する。スパーサーは、例えば遊離アミノ基とポリエチレングリコールとの結合を仲介するもの、或いは遊離カルボキシル基とポリエチレングリコールとの結合を仲介するもの等が挙げられる。遊離アミノ基と結合する活性型ポリエチレングリコールとして、例えば次式で表される、

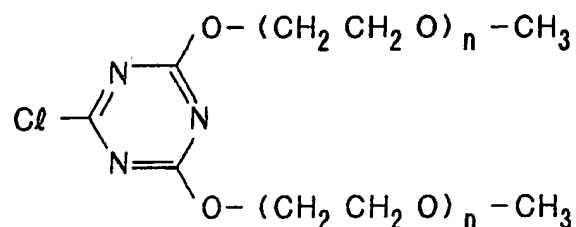


ポリエチレングリコールのコハク酸エステルを N-ヒドロキシスクシニルイミドにより活性化した N-ヒドロキシスクシニルイミドポリエチレングリコートが使われる。また、遊離アミノ基と結合するその他の活性型ポリエチレングリコールとしては



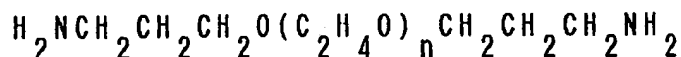
- 7 -

次式で表される、



ポリエチレングリコールモノメチルエーテルと塩化シアヌール酸より合成される2,4-ビス(0-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロル-s-トリアジンが挙げられる。

また、遊離カルボキシル基と結合する活性型ポリエチレングリコールとしては、例えば次式で表される、



ポリオキシエチレンジアミンが使われる。

共有結合修飾反応は、生物学的に活性な材料を活性型ポリエチレングリコールと反応せしめるために一般に使用される適当な任意の方法により実施し得る。ヒトG-C-S-F上の反応性アミノ酸が遊離アミノ基を有するアミノ酸残基である場合には好ましくはpH 7.5~10.0において行われる。該反応は、例えばリ

ン酸塩、ホウ酸塩等の緩衝液中 pH 7.5~10.0, 温度 4~37℃で 1~5 時間行う。ヒト G-C S F の遊離アミノ基に対し、活性型ポリエチレングリコールを 1~200 倍モル量、好ましくは 5~50 倍モル量用いる。一方、ヒト G-C S F 上の反応性アミノ酸が遊離カルボキシル基を有するアミノ酸残基である場合には、好ましくは pH 3.5~5.5 において行われ、例えばポリオキシエチレンジアミンを活性型ポリエチレングリコールとして使用する反応では、pH 4.0~5.0 でカルボジイミド存在下、温度 4~37℃で 1~24 時間行う。ヒト G-C S F の遊離カルボキシル基に対し、活性型ポリエチレングリコールを 1~200 倍モル量用いる。

なお、アミノ酸残基の修飾率は、上記の活性型ポリエチレングリコールの使用量の範囲により、その使用量に応じ自由に変動させることができる。

所望により、反応液は、透析、塩析、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過、電気泳動など、通常の蛋白質の精製法で精製し、目的とするポリエチレングリコール修飾ヒト G-C S F、即ち本発明の化学修飾蛋白質を得ることができる。特にイオン交換クロマトグラフィーは、ポリエチレングリ

コール及びヒト G - C S F の除去に有効である。

本発明のポリエチレングリコール修飾ヒト G - C S F は、  
(おそらくその体内でのクリアランスが延びるため)薬理作用  
の持続時間が長くなっている。更には、白血球減少時における  
白血球の回復をより早めることが認められている。

本発明のポリエチレングリコール修飾ヒト G - C S F は、未  
修飾ヒト G - C S F と本質的に同様の生物学的活性を有してい  
るため、未修飾ヒト G - C S F と同様の用途に有効である。即  
ち、好中球を増加させるという生物学的活性により、通常の造  
血障害の治療に加えて、化学療法又は放射線療法による造血障  
害の治療、骨髄移植時或いは感染症治療に有効である。

ポリエチレングリコール修飾ヒト G - C S F は、医薬上許容  
可能な希釈剤、等張化剤、pH調整剤等と調合することにより、  
患者に投与可能な製剤として用いることができる。

ポリエチレングリコール修飾ヒト G - C S F を有効成分とす  
る製剤の投与方法は、治療目的に応じて変化し得るが、皮下、  
筋肉内及び静脈への注射、或いは経口によって実施される。投  
与量は、その対象となる疾患及び患者の病状に合わせて決める  
ことができるが、注射の場合はヒト G - C S F 重量として通常

- 10 -

成人一人当たり  $0.1\mu\text{g} \sim 5\text{mg}$ 、経口の場合には同じく  $0.1\text{mg} \sim 5\text{g}$  を投与することができる。

[ 図面の簡単な説明 ]

第1図はポリエチレングリコール修飾ヒトG-CSFのSDS-PAGEゲルのスキャニングパターンを示す。ヒトG-CSFのアミノ基に対する活性型ポリエチレングリコールのモル比が、夫々(a)0, (b)1, (c)5, (d)10, (e)50で得られた生成物を示す。未修飾ヒトG-CSFは、19K(※印のピーク)である。

第2図はヒトG-CSF及びポリエチレングリコール修飾ヒトG-CSFを投与後のマウスの好中球の変化を示す。尚、図中の各点は6匹のマウスについて得られた平均値±標準偏差を示す。

第3図はシクロホスファミド投与マウスの好中球減少に対するヒトG-CSF及びポリエチレングリコール修飾ヒトG-CSFの効果を示す。尚、図中の各点は6匹のマウスについて得られた平均値±標準偏差を示す。

第4図は5-フルオロウラシル投与マウスの好中球減少に対するヒトG-CSF及びポリエチレングリコール修飾ヒトG-

- 11 -

C S F の効果を示す。尚、図中の各点は 6 匹のマウスについて得られた平均値 ± 標準偏差を示す。

第 5 図はヒト G - C S F (●) 及び P E G (10000) G - C S F (○) の血清中における消失半減期を示す。尚、図中の各点は 3 匹のラットについて得られた平均値 ± 標準偏差を示す。

[ 発明を実施するため最良の形態 ]

以下の実施例で本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

#### 実施例 1

##### P E G ( 4500 ) G - C S F の作成

修飾に用いたヒト G - C S F は、遺伝子組換え技術によって発現させたもので (特表昭 63-500636)、次のアミノ酸配列よりなるポリペプチドである。

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu  
Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln  
Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu  
Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys  
His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser  
Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys

- 12 -

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu  
Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln  
Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro  
Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu  
Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln  
Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu  
Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala  
Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu  
Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val  
Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

ポリエチレングリコールは、平均分子量が約4,500 のポリエチレングリコールのコハク酸エステルをN-ヒドロキシスクシニルイミドにより活性化したN-ヒドロキシスクシニルイミドポリエチレングリコート（活性型PEG）（日本油脂製）を使用した。

ヒトG-CSFを、0.25Mホウ酸ナトリウム緩衝液（pH 8.0）中で、活性型PEGと4℃で1時間反応させた。活性型PEG量は、ヒトG-CSF中の遊離アミノ基に対して1～50倍量を用いた。

- 13 -

用いた。生成物は、予め  $10\text{mM NH}_4\text{HCO}_3$  で平衡化させた Sephadex G25 で緩衝液交換をした後、DEAEイオン交換クロマトグラフィーを用いて、種々の形のポリエチレングリコール修飾ヒトG-CSF (PEG修飾ヒトG-CSF) を試薬及び必要に応じ未反応ヒトG-CSF から分離した。以降、この反応で得られたPEG修飾ヒトG-CSF を、PEG (4500) G-CSF という。

## 実施例 2

### PEG (4500) G-CSF の特徴付け

実施例 1 で作成したPEG (4500) G-CSF の特徴付けを、未修飾アミノ基数及びSDS-PAGEによる分子量の推定によって行なった。

未修飾アミノ基数の測定は、Habeeb等の方法 (Anal. Biochem., 14, pp 328-336, (1966)) に従って、 $4\% \text{NaHCO}_3$  中で  $0.1\% \text{TNBS}$  と反応させ、 $335\text{nm}$  の吸光度を測定することによって行なった。

また一方、反応物の分子量の特徴付けは、SDS-PAGE (16%ゲル, CBB染色) 上で行なった。反応物を、Laemliの方法 (Nature, 227, pp680, (1970)) に準じてSDS-PAGE

- 14 -

Eを行い、CBB染色を行なった。染色の後に、各ゲルの各レーンのスキヤニングを行なった。測定には島津クロマトスキヤナ(CS-930)を用いた。

ヒトG-CSFのアミノ基に対する活性型PEGの比率が増加するにつれて、修飾の程度が増加した。活性型PEG/アミノ基(モル比)が1の試料では、未修飾ヒトG-CSFのバンド(19K)の他に、約26Kの見かけの分子量を有する1本のバンドが認められた。また、活性型PEG/アミノ基が5及びそれ以上の試料では、上記のバンドの他に更に大きな分子量を有するバンドが認められた。スキヤニングの結果より、各試料について各バンドの含有率を求めた(表1)。この結果と未修飾アミノ基平均個数(表1)とを考え合わせると、26Kのバンドを示すものはヒトG-CSFに1分子の活性型PEGが結合したものであり、34Kのバンドを示すものはヒトG-CSFに2分子の活性型PEGが結合したものであると推定された。



- 15 -

表 1 PEG (4500) G-C S F の特徴付け

PEG/NH <sub>2</sub>	分子量分布 (%)			被修飾 NH <sub>2</sub> 基 (%)	未修飾 NH <sub>2</sub> 基 平均個数
	19K	26K	34K		
1	86	12		5	4.8
2	68	31	1	15	4.3
3	56	42	2	15	4.3
4	36	48	16	20	4.0
5	31	49	20	27	3.7
6	25	50	25	27	3.7
7	20	50	28	27	3.7

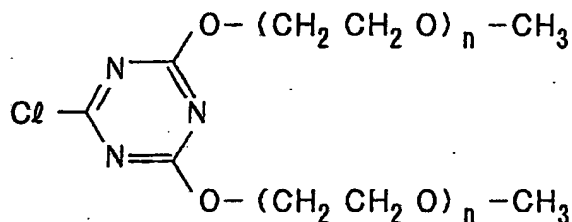
また、イオン交換クロマトグラフィーから溶出された画分の SDS-PAGE のパターンにより、より修飾された分子種ほど早く溶出し、最後に溶出された画分が未修飾ヒト G-C S F であることがわかった。

更に活性型 PEG / アミノ基を増加させた場合も含めた、SDS-PAGE のスキャニング図を、図 1 に示した。

- 16 -

実施例 3PEG (10000) G-C S F の作成

修飾に用いたヒト G-C S F は、実施例 1 に示したのと同じである。ポリエチレングリコールは、ポリエチレングリコールモノメチルエーテルと塩化シアヌール酸より合成された下式に示す平均分子量約 10,000 の活性型ポリエチレングリコール（活性型 PEG 2）（生化学工業製）を使用した。



ヒト G-C S F を、0.25M ホウ酸ナトリウム緩衝液（pH10.0）中で、活性型 PEG 2 と室温で 1 時間反応させた。活性型 PEG 2 量は、ヒト G-C S F 中の遊離アミノ基に対して 5 倍量を用いた。生成物は、予め 10mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  で平衡化させた Sephadex G25 で緩衝液交換をした後、DEAE イオン交換クロマトグラフィーを用いて、PEG 修飾ヒト G-C S F を試薬及び未反応ヒト G-C S F から分離した。実施例 2 と同様に SD

- 17 -

S-PAGE 上にて分子量の推定を行ったところ、平均分子量は 45K であり、その分布は 30K (10%)、40K (70%) 及び 66K (20%) であった。この反応で得られた PEG 修飾ヒト G-CSF を、以降、PEG (10000) G-CSF という。

更に、ヒト G-CSF を 0.25M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.0) 中で、活性型 PEG 2 と室温で 2 時間反応させた。活性型 PEG 2 量はヒト G-CSF 中の遊離アミノ基に対して 10 倍量を用いた。生成物は予め 10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  で平衡化させた Sephadex G25 で緩衝液交換をした後、DEAE イオン交換クロマトグラフィーを用いて PEG 修飾ヒト G-CSF を分離した。実施例 2 と同様に SDS-PAGE 上にて分子量の推定を行なったところ、分子量は 30K であり、これは、ヒト G-CSF に 1 分子の活性型 PEG が結合したものであると推定された。

また、同様にヒト G-CSF 中の遊離アミノ基に対して 50 倍量の PEG 2 を用いて反応させ、PEG 修飾ヒト G-CSF を分離した。同様にして分子量の推定を行ったところ、平均分子量は 51K であり、その分布は 40K (58%)、66K (42%) であった。

#### 実施例 4

##### PEG (4000) G-C S F の作成

ヒト G-C S F 中の遊離カルボキシル基へポリエチレングリコールを共有結合させた PEG 修飾ヒト G-C S F を作成した。ポリエチレングリコールは、平均分子量が約 4,000 のポリオキシエチレンジアミン（活性型 PEG；化学式は前述）（日本油脂製）を使用した。

ヒト G-C S F と活性型 PEG を、pH 4.5 において 0.05 M の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドの存在下で、室温で一晩反応させた。なお、活性型 PEG 量は、ヒト G-C S F 中の遊離カルボキシル基に対して 60 倍量を用いた。1 M 酢酸ナトリウム (pH 4.75) を加えることにより、反応を停止し、更にチロシンの再生をするために、0.5 M ヒドロキシアミン中で 25℃、5 時間反応させた。生成物は、予め 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) で平衡化させた TSK G3000 SW カラムを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行い、PEG 修飾ヒト G-C S F を試薬及び未反応ヒト G-C S F から分離した。実施例 2 と同様に SDS-PAGE 上にて分子量の推定を行なったところ、分子量とその分布は 27K (70%)、35K

- 19 -

(20%) 及び 42K (10%) であった。この反応で得られた PEG 修飾ヒト G-CSF を、以降、PEG (4000) G-CSF という。

#### 実施例 5

PEG (4500) G-CSF の in vivo での薬理効果 実施例 1 で作成した PEG (4500) G-CSF について、マウスにおける薬理効果を調べた。マウス (ICR (♂) ; 実験 I では 4 週令を、実験 II では 8 週令を用いた。) に試料を 10  $\mu$ g protein/kg あるいは 100  $\mu$ g protein/kg の用量で静脈内に投与後、前者は 24 時間後、後者は 32 時間後にマウスの眼窩静脈叢より採血し、自動血球計数装置 (E-2000, 東亜医用電子) にて白血球数を測定した。また、同時に血液塗末標本をライト染色し、自動血球分類装置 (MICROX, 立石電機) にて白血球分画を測定し、好中球数を求めた。その結果を、表 2 に示す。

PEG (4500) G-CSF としては、(1) 活性型 PEG / アミノ基が 5 で反応させた時の生成物 (図 1, C), (2) DEAE イオン交換クロマトグラフィーを用いて分画した 26K 画分、および (3) DEAE イオン交換クロマトグラフィーを用いて分画した高分子画分 (26K : 14%, 34K : 55%, > 34K : 28% を含

- 20 -

む)を用いた。

P E G ( 4500 ) G - C S F ( 1 ) , ( 2 ) , ( 3 ) では、未修飾ヒト G - C S F に比べ、好中球数が増加していた。全般的傾向として、比較的修飾率の高い試料 ( 1 ) , ( 3 ) において、その効果はより顕著であった。

通常、ヒト G - C S F を 10  $\mu$ g protein / kg の用量でマウスに投与した場合、好中球数は増加し、約 6 ~ 12 時間後に最大となり、その後は徐々に減少し、ほぼ 30 時間で正常レベルに戻る。本実験でのこの用量での採血時間 ( 24 時間 ) は、好中球数がもとのレベルに戻る直前の時間である。100  $\mu$ g protein / kg の用量の採血時間 ( 32 時間 ) の決定も同様の原理に基づいて行なわれた。従って、これらの時間で P E G ( 4500 ) G - C S F ( 1 ) , ( 2 ) , ( 3 ) を投与したマウスにおいて、未修飾ヒト G - C S F を投与したマウスと比べて好中球が多いことは、本試料の好中球増加作用が持続している可能性を示唆する。

なお、P E G と未修飾ヒト G - C S F を結合させずに混合しただけでは、未修飾ヒト G - C S F のみの場合と変わらなかった ( データ省略 ) 。

- 21 -

表 2 PEG 修飾ヒト G-CSF の in vivo 薬理効果

群	匹数	好中球数 ( $\times 10^2 / \mu\text{l}$ )	ベヒクルに 対する比
<u>a. 10 <math>\mu\text{g}</math> / Kg</u>			
< 実験 I >			
ベヒクル	5	$5.6 \pm 1.0$	1.0
コントロール G-CSF	6	$9.6 \pm 1.4$	1.7
PEG(4500)G-CSF(1)	6	$20.8 \pm 2.6$	3.7
PEG(4500)G-CSF(2)	6	$17.5 \pm 3.0$	3.1
< 実験 II >			
ベヒクル	6	$12.3 \pm 1.7$	1.0
コントロール G-CSF	6	$27.1 \pm 4.6$	2.2
PEG(4500)G-CSF(3)	6	$54.0 \pm 7.2$	4.4
<u>b. 100 <math>\mu\text{g}</math> / Kg</u>			
< 実験 I >			
ベヒクル	6	$6.6 \pm 0.7$	1.0
コントロール G-CSF	6	$18.5 \pm 2.3$	2.8
PEG(4500)G-CSF(1)	6	$42.9 \pm 4.3$	6.5
PEG(4500)G-CSF(2)	6	$22.6 \pm 1.9$	3.4

- 22 -

実施例 6PEG(4000)G-CSFのin vivoでの薬理効果

実施例4で作成したPEG(4000)G-CSFについて、マウスにおける薬理効果を調べた。マウス(ICR(♂); 7週令)に試料を10 $\mu$ g protein/kgの用量で静脈内に投与し、24時間後にマウスの眼窩静脈叢より採血し、実施例5と同様に好中球数を求めた。その結果を、表3に示す。カルボキシル基にポリエチレングリコールを結合させたPEG(4000)G-CSFの場合においても、未修飾ヒトG-CSFに比べ、好中球が増加していた。

表 3 PEG(4000)G-CSFのin vivo  
薬理効果

群	匹数	好中球数 ( $\times 10^2$ / $\mu$ l)	ベヒクルに 対する比
<u>10<math>\mu</math>g / kg</u>			
ベヒクル	6	10.9 $\pm$ 1.0	1.0
コントロール ヒト G-CSF	6	16.4 $\pm$ 1.4	1.5
PEG(4000)G-CSF	6	23.3 $\pm$ 2.5	2.1



- 23 -

実施例 7PEG 修飾ヒト G-CSF の好中球増加作用

実施例 1 及び実施例 3 で作成した PEG (4500) G-CSF 及び PEG (10000) G-CSF について、マウスにおける好中球増加作用を経時的に調べた。マウス (ICR (♂) ; 7 週令) に試料を 10 µg protein/kg の用量で静脈内に投与後、6, 24, 32, 48 及び 72 時間後にマウスの眼窩静脈叢より採血し、実施例 5 と同様に好中球数を求めた。但し、自動血球計数装置は、CC180-A (東亜医用電子) を用いた。また、PEG 修飾 G-CSF としては、PEG (4500) G-CSF (活性型 PEG / アミノ基を 50 で反応させ、DEAE イオン交換クロマトグラフィーを用いて分画した高分子画分 ; 平均分子量 60K ; 分子量分布 : 38K (20%) , 58K (54%) , 80K (27%) ; 実施例 1 参照) 及び PEG (10000) G-CSF を用いた。

図 2 に示したように、未修飾ヒト G-CSF では、投与 24 時間後には好中球が通常レベルまで戻るのに対して、PEG (4500) G-CSF では 32 時間後、PEG (10000) G-CSF では 48 時間後まで、好中球の有意な増加が認められた。

なお、実施例 3 で作成した (a) 分子量 30K の PEG (10000)

- 24 -

G-C S F、及び(b) 平均分子量51K；分子量分布：40K（58%）、66K（42%）のPEG(10000) G-C S Fについてもマウスにおける好中球増加作用を調べた。マウス（ICR（♂）；8週令）に試料を10 $\mu$ g protein/kgの用量で静脈内に投与し、24時間後にマウスの眼窩静脈叢より採血し、実施例5と同様に好中球数を求めた。その結果を表4に示す。

表4 PEG(10000) G-C S Fのin vivo 薬理効果

群	匹数	好中球数 ( $\times 10^2$ / $\mu$ l)	ベヒクルに 対する比
ベヒクル	5	7.4 $\pm$ 0.6	1.0
G-C S F	5	16.4 $\pm$ 3.1	2.2
PEG(10000) G-CSF (a)	5	68.9 $\pm$ 10.5	9.3
PEG(10000) G-CSF (b)	5	95.8 $\pm$ 6.4	12.9

PEG(10000) G-C S F (a), (b) でも、未修飾 G-C S F に比べ、好中球数が増加していた。PEG(4500) G-C S F の場合と同様に修飾率の高い試料においてその効果はより大きかった。

- 25 -

実施例 8PEG修飾ヒトG-CSFのシクロホスファミド投与マウスの  
好中球減少に対する効果

実施例7で使用したのと同じPEG(4500)G-CSF及びPEG(10000)G-CSFについて、シクロホスファミド(CY)による好中球減少に対する効果を調べた。マウス(ICR(♂)7週令)にCY 200mg/kgを腹腔内投与(day 0とする)し、好中球減少マウスを作成した。試料10µg protein/kg/日をCY投与翌日(day 1)からday 4まで1日1回、4日間尾静脈内投与し、最終投与後、6、24及び48時間後の各点で実施例5と同様に採血し好中球数を求めた。

図3に示したように、PEG修飾ヒトG-CSFにおいても、未修飾ヒトG-CSFと同様或いはそれ以上にCY投与による好中球減少からの回復を早める効果が認められた。特に、PEG(10000)G-CSFでは、更に好中球の顕著な増加が認められた。

実施例 9

実施例7で使用したのと同じPEG(10000)G-CSFについて、雌性BDF<sub>1</sub>マウス(7週令、日本SLC株式会社)

- 26 -

を用いて 5-FU による好中球減少に対する効果を調べた。マウスに 5-FU 200mg/kg を静脈内投与し (day 0 とする)、好中球減少マウスを作成した。試料 10 $\mu$ g protein/kg/日を 5-FU 投与翌日 (day 1) から day 11 まで 1 日 1 回合計 11 回 (PEG 1)、day 1, 3, 5, 7, 9, 11 の 2 日に 1 回合計 6 回 (PEG 2) および day 1, 4, 7, 10 の 3 日に 1 回合計 4 回 (PEG 3) のスケジュールで皮下投与を行なった。対照として未修飾 G-CSF 10 $\mu$ g protein/kg/日を day 1 から day 11 まで 1 日 1 回合計 11 回皮下投与した。好中球数は実施例 5 同様の方法で day 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, および 17 で採血し求めた。

第 4 図に示したように 5-FU のみの投与では好中球の正常レベルへの回復に約 14 日間かかるのに対して未修飾 G-CSF を投与した群では 11 日間、PEG 1, 2, 3 投与群では 9 日間であった。このように PEG 修飾 G-CSF は未修飾 G-CSF と比べて好中球の回復を早くし、さらに PEG 修飾 G-CSF の投与回数を未修飾 G-CSF の投与回数より減らしても好中球減少からの回復効果は PEG 修飾 G-CSF のほうが上まわっていた。

実施例 10P E G 修飾ヒト G - C S F の急性毒性試験

実施例 7 で使用したものと同一 P E G ( 4500 ) G - C S F 及び P E G ( 10000 ) G - C S F について、急性毒性試験を行なった。

雌雄の S l c : I R マウス ( 5 週令 ) 各 6 匹を 1 群とし、投与液量は  $12 \text{ ml} / \text{kg}$  とした。比較のため、ベヒクル投与群をおいた。観察については、投与日は投与後 6 時間まで可能な限り頻回、その後原則として 14 日間は毎日 1 回行い、一般状態の観察と生死の確認を行なった。体重の測定は、投与日、第 5、8、12 及び 15 日目に行なった。生存例は、観察期間終了後エーテル麻酔下に放血致死させ剖検した。

結果は、表 4 に示したとおり、観察期間中に死亡例はなく、 $\text{LD}_{50}$  値は P E G ( 4500 ) G - C S F 及び P E G ( 10000 ) G - C S F いずれも雌雄とも  $3,000 \mu\text{g} / \text{kg}$  以上であった。一般状態、体重及び剖検所見でも、P E G ( 4500 ) G - C S F 及び P E G ( 10000 ) G - C S F 投与に関連した重篤な変化は認められず、未修飾ヒト G - C S F と同様にその毒性は極めて弱いと考えられた。

表 5

## マウスの死亡率

性別	化合物	投与量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	死 亡 数															死亡率*	LD <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15 (日)		
雄	ベヒクル	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6	—
	PEG4500-G-CSF	3,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6	>3,000
	PEG10000-G-CSF	3,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6	>3,000
雌	ベヒクル	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6	—
	PEG4500-G-CSF	3,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6	>3,000
	PEG10000-G-CSF	3,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/6	>3,000

\* 死亡数 / 処理検体数

1 2 8 1

- 29 -

実施例 11P E G 修飾ヒト G - C S F の消失半減期の測定

以下に述べる各々の採血時間あたり3匹の出生後7週令のSD系雄性ラットに、ヒトG-C S F又は実施例3で得られたP E G (10000) G - C S F 100 $\mu$ g protein/Kgを、それぞれ尾静脈より注入した。ヒトG-C S FおよびP E G (10000) G - C S Fを投与してから、10分、2、4、8、24、48時間経過後、各個体毎に腹大動脈より、約15mlの容量をもつポリプロピレンチューブ中に約6から7ml相当を採血し、4℃において18000xg、5分間遠心することによって血清画分を採取し、この血清試料中における活性を保持したヒトG-C S F蛋白量をマウス骨髄細胞を用いた<sup>3</sup>H-thymidine 取込みを指標としたバイオアッセイ (Ralph ら、Blood 68, pp633-639 (1988)) によって測定した。血清中ヒトG-C S F蛋白濃度の経時的な変化を第5図に示した。さらに、その測定値よりヒトG-C S FおよびP E G (10000) G - C S Fの消失半減期を算出したところ、それぞれ、1.79時間および7.05時間であった。また、ヒトG-C S FおよびP E G (10000) G - C S Fの血清中濃度-時間曲線下面積 (A U C) を算出したところ、それぞれ、2000 ng蛋白

- 30 -

・ 時間 / ml および 16195 ng 蛋白 ・ 時間 / ml であった。

以上のことから明らかなように、本発明の PEG 修飾ヒト G-CSF は、ヒト G-CSF に比べ体内からの消失が抑制されていることがわかる。

〔産業上の利用可能性〕

本発明が提供するポリエチレングリコール修飾ヒト G-CSF は、未修飾ヒト G-CSF と比較して、薬効（好中球の増加作用）がより長く持続することにより、生体内投与の際に、より少量でのより少ない回数の投与が可能となり、ヒト G-CSF を用いる治療に一層貢献し得ることが期待される。



- 3 1 -

## 請 求 の 範 囲

(1) 実質的に以下のアミノ酸配列を有し、外来性DNA配列の宿主細胞による発現産物であることを特徴とするポリペプチドにポリエチレングリコールを結合してなる化学修飾蛋白質。

(Met)n

Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln  
Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg  
Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu  
Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro  
Glu Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly  
Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser  
Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln  
Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu  
Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu  
Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val  
Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met  
Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro  
Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala

- 3 2 -

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala  
Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr  
Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

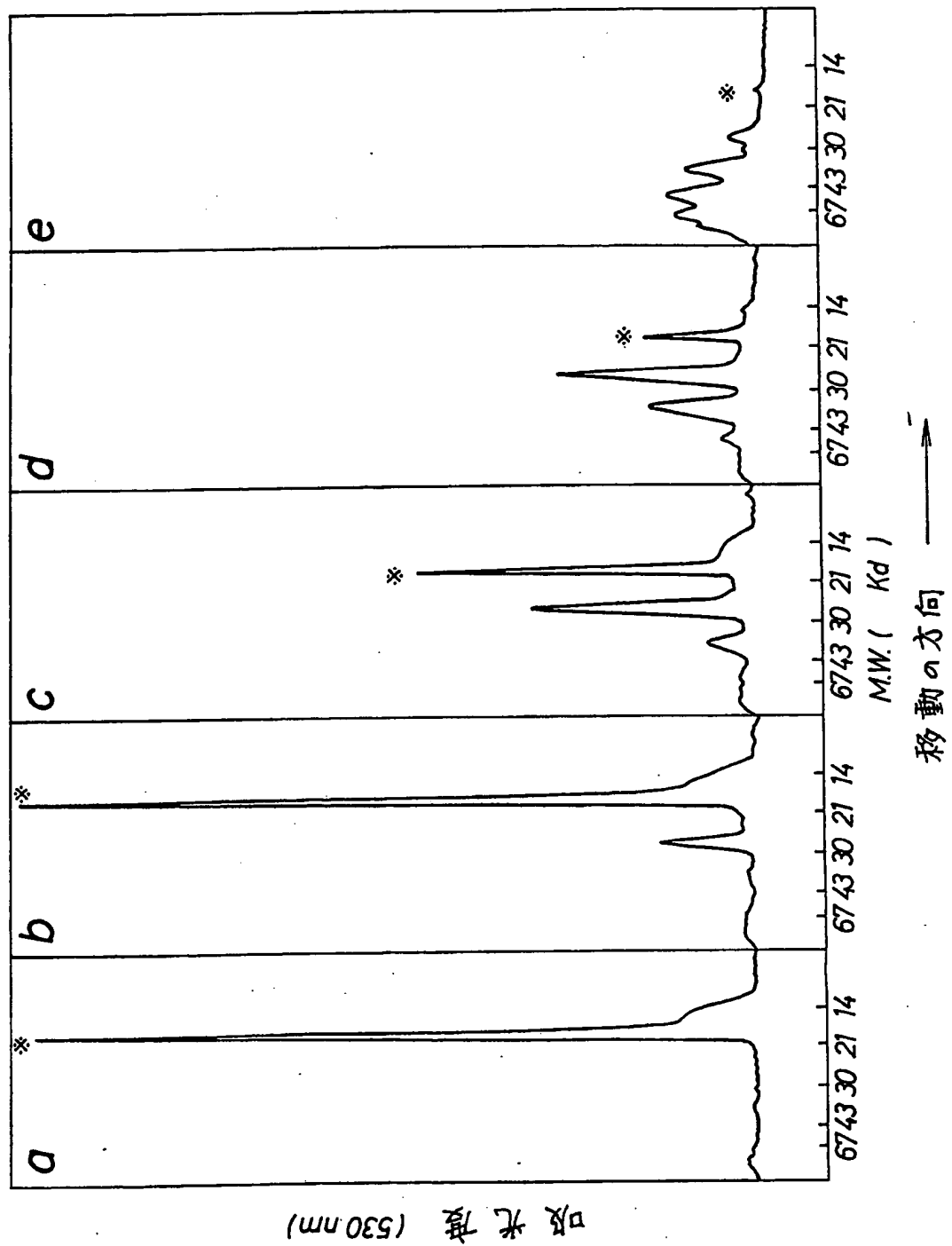
(n=0又は1)

(2) ポリエチレングリコールが、ポリペプチドのアミノ酸のアミノ基を介して結合する請求の範囲第1項に記載の化学修飾蛋白質。

(3) ポリエチレングリコールが、ポリペプチドのアミノ酸のカルボキシル基を介して結合する請求の範囲第1項に記載の化学修飾蛋白質。

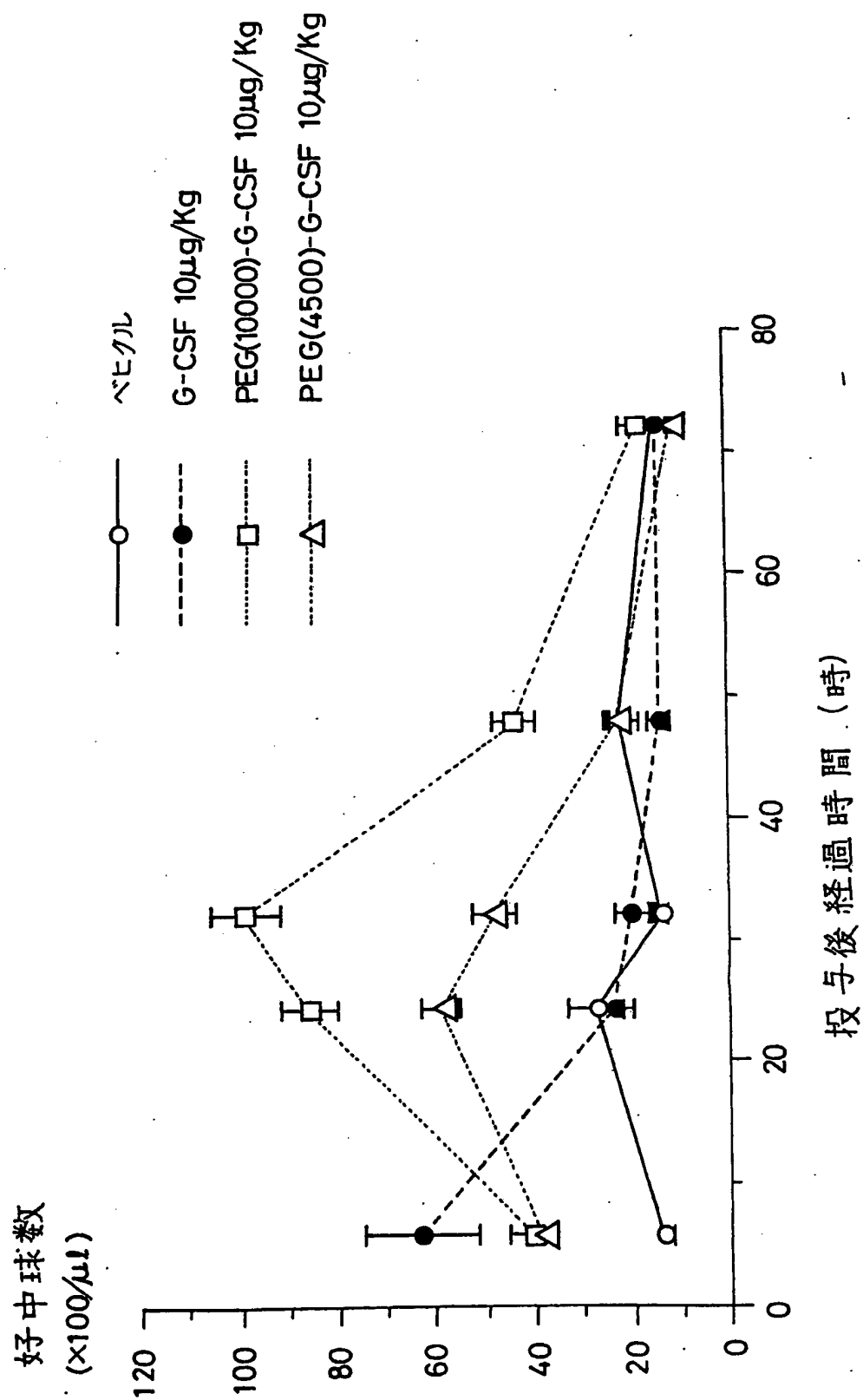
1/5

第 1 図



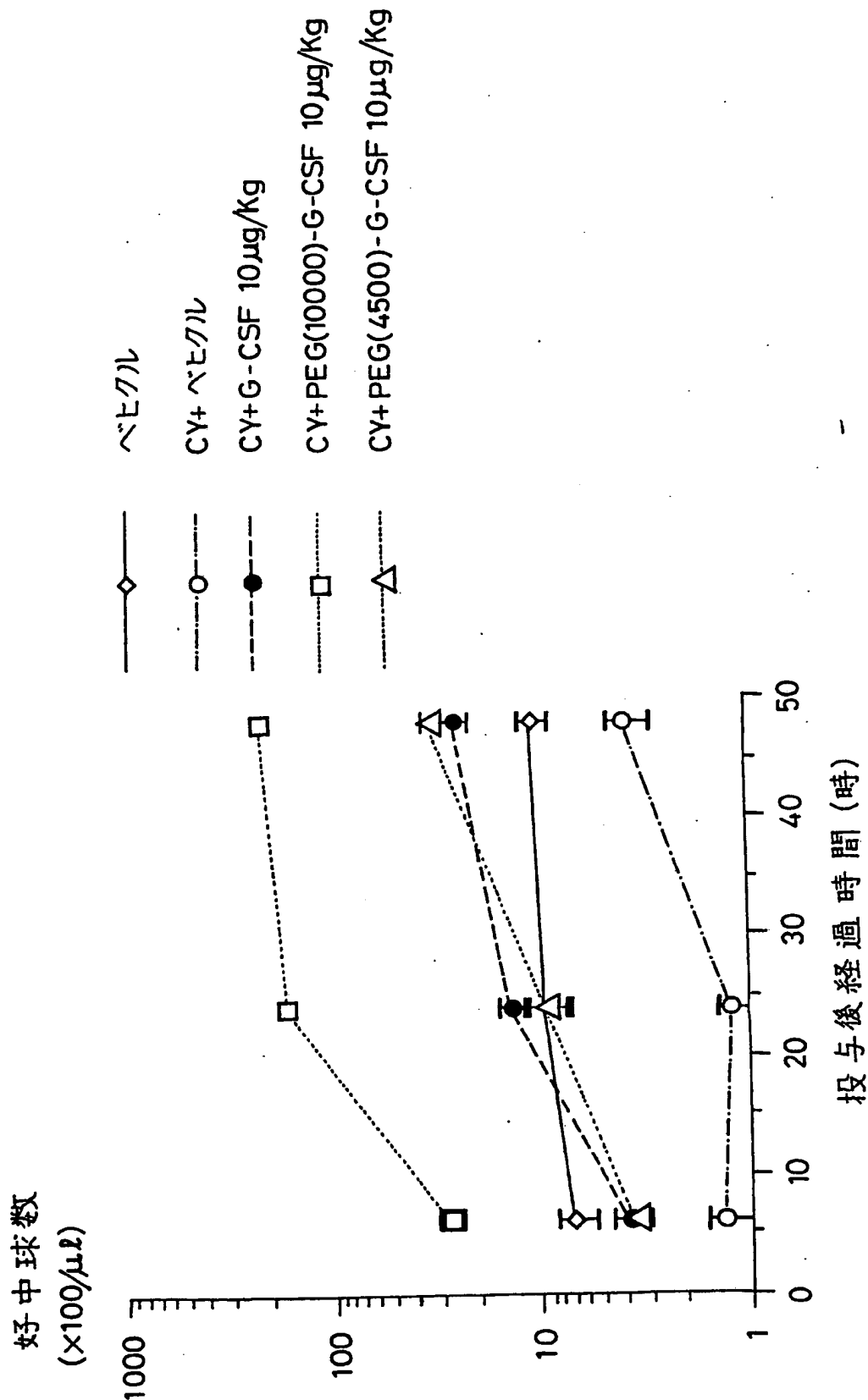
2/5

第 2 図



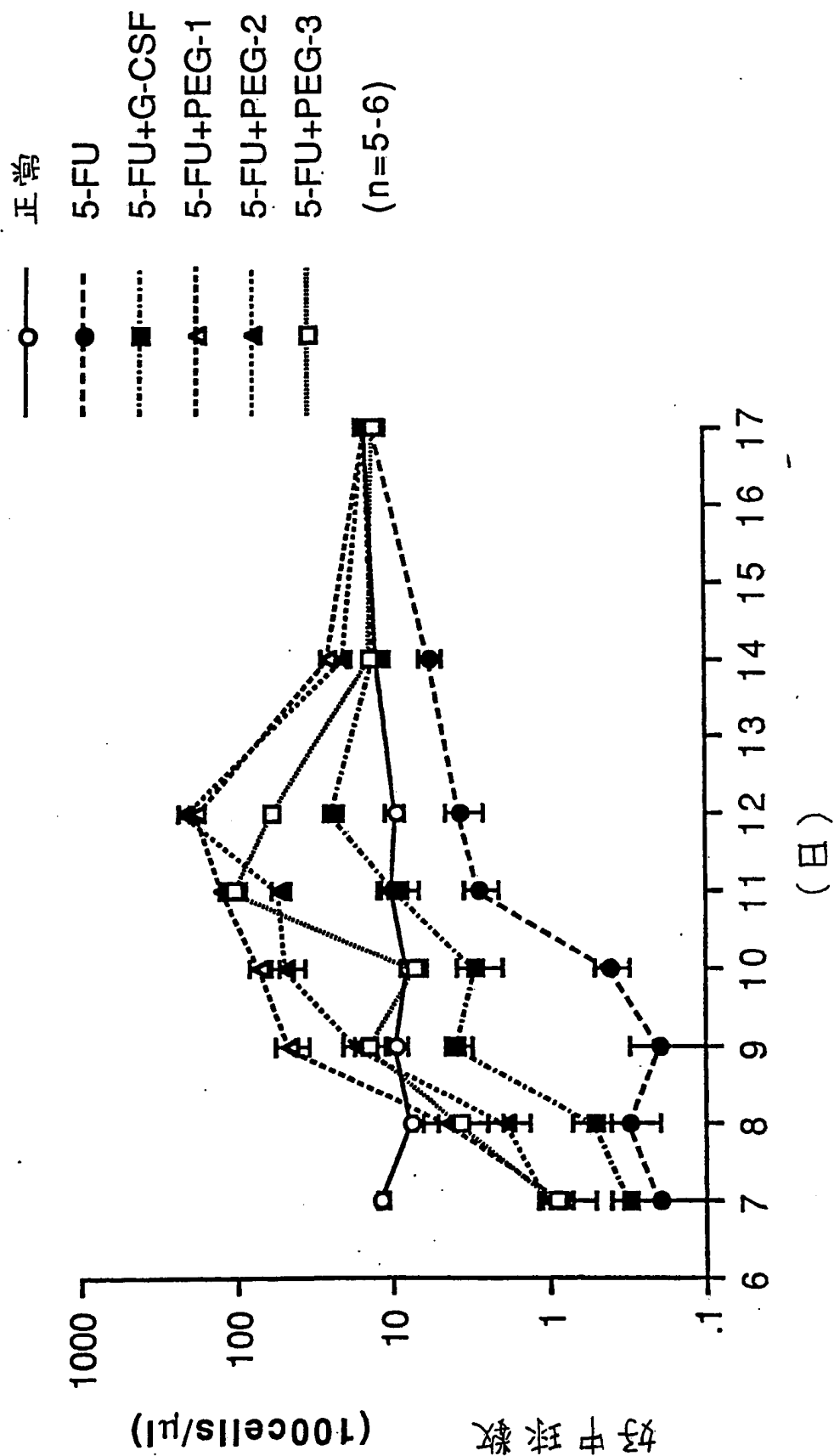
3/5

第 3 図



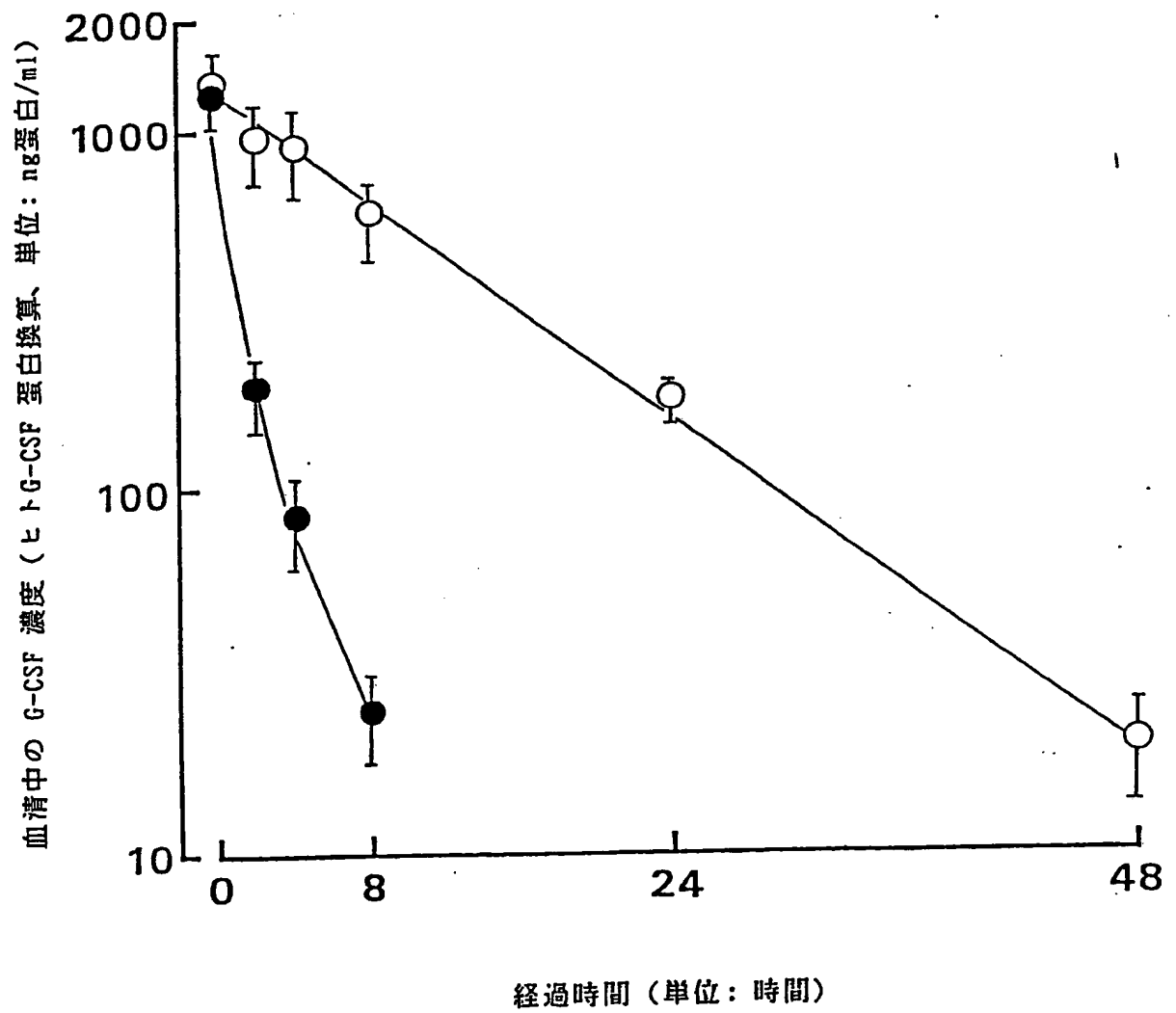
4/5

第4図



5/5

## 第 5 図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP89/01292

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) * According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl <sup>5</sup> C07K13/00, 3/08, A61K37/02		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched †		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	C07K13/00, 15/06, 3/08, 15/12, A61K37/02	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ‡		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> §		
Category *	Citation of Document, †† with indication, where appropriate, of the relevant passages ‡‡	Relevant to Claim No. ‡‡
P	JP, A, 1-316400 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 21 December 1989 (21. 12. 89), Pages 2 to 4 & EP, A, 335423 & AU, A, 8932341	1 - 2
X	JP, A, 63-10800 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 18 January 1988 (18. 01. 88), Pages 2 to 5 & EP, A, 236987	1 - 3
X	JP, A, 57-192435 (Toyobo Co., Ltd.), 26 November 1982 (26. 11. 82), Pages 2 to 3 (Family: none)	1 - 3
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: ††</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; padding: 5px;">             March 6, 1990 (06. 03. 90)           </div>		Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; padding: 5px;">             March 19, 1990 (19. 03. 90)           </div>
International Searching Authority <div style="text-align: center; padding: 5px;">             Japanese Patent Office           </div>		Signature of Authorized Officer



I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C07K13/00. 3/08. A61K37/02		
II. 国際調査を行った分野		
調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料		
分 類 体 系	分 類 記 号	
IPC	C07K13/00, 15/06, 3/08, 15/12, A61K37/02	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の ※ カテゴリ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
P	JP, A, 1-316400 (協和醸酵工業株式会社), 21. 12月. 1989 (21. 12. 89), 第2頁-第4頁 & EP, A, 335423 & AU, A, 8932341	1-2
X	JP, A, 63-10800 (武田薬品工業株式会社), 18. 1月. 1988 (18. 01. 88), 第2頁-第5頁 & EP, A, 236987	1-3
X	JP, A, 57-192435 (東洋紡績株式会社), 26. 11月. 1982 (26. 11. 82), 第2頁-第3頁 (ファミリーなし)	1-3
<p>※ 引用文献のカテゴリ</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 証 証		
国際調査を完了した日 06. 03. 90	国際調査報告の発送日 19.03.90	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 前 田 憲 彦 ®	4 H 8 3 1 8